

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-009957

(43)Date of publication of application : 16.01.1996

(51)Int.Cl.

C12M 1/00

G01N 33/50

// C12Q 1/68

(21)Application number : 07-149262

(71)Applicant : BOEHRINGER MANNHEIM
GMBH

(22)Date of filing : 15.06.1995

(72)Inventor : BIENHAUS GERHARD DIPL
CHEM DR
LANGE HANS

(30)Priority

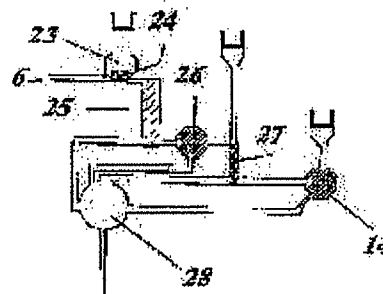
Priority number : 94 4420732 Priority date : 15.06.1994 Priority country : DE

(54) DEVICE FOR PROCESSING SAMPLE FOR THE PREPARATION OF NUCLEIC ACIDS FOR ANALYTICAL AMPLIFICATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a simple device for treatment of nucleic acids without contamination.

CONSTITUTION: This device for treatment of nucleic acids from samples comprises the first reaction chamber 26 for separating the nucleic acids from other sample components and the second reaction chamber 14 for the amplification of the nucleic acids, that is connected through a controllable transport path to the first reaction chamber 26.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.06.1995

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 18.01.2000

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3130449

[Date of registration] 17.11.2000

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection] 2000-005384

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection] 14.04.2000

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-9957

(43) 公開日 平成8年(1996)1月16日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 1/00	A			
G 0 1 N 33/50	P			
// C 1 2 Q 1/68	Z	9453-4B		

審査請求 有 請求項の数18 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平7-149262

(22) 出願日 平成7年(1995)6月15日

(31) 優先権主張番号 P 4 4 2 0 7 3 2 . 8

(32) 優先日 1994年6月15日

(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 591005589
バーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
BOEHRINGER MANNHEIM
GESELLSCHAFT MIT B
ESCHRANKTER HAFTUNG
ドイツ連邦共和国、68305 マンハイム、
ザントホーファー シュトラッセ 116

(74) 代理人 弁理士 朝日奈 宗太 (外3名)

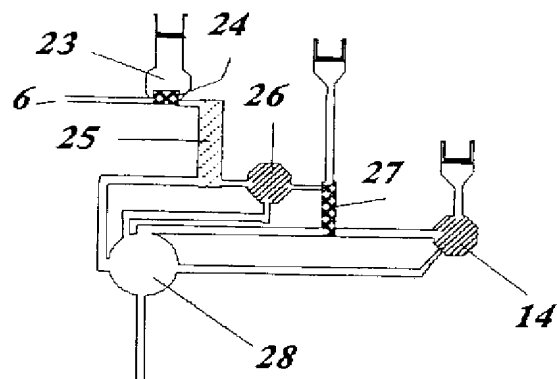
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サンプル中の核酸を処理する装置

(57) 【要約】

【目的】 コンタミネーションのない単純な、核酸の処理の装置を提供する。

【構成】 他のサンプル成分から核酸を分離する第1の反応チャンバと、制御する輸送経路によって前記第1の反応チャンバと結合された、核酸の増幅のための第2の反応チャンバとからなるサンプルからの核酸の処理のための装置である。



2 3、2 7 モジュール
2 6 チャンバ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 サンプル調製のための第 1 の反応チャンバと、輸送経路を介して前記第 1 の反応チャンバと接続された、核酸の増幅のための第 2 の反応チャンバとからなることを特徴とするサンプル中の核酸を処理するための装置。

【請求項 2】 前記装置が、少なくとも 1 つの試薬を少なくとも 1 個の反応チャンバの中へと加えるために、コンタミネーションの危険なしにいくつかの位置に開口されうる密閉されたシステムである請求項 1 記載の装置。

【請求項 3】 サンプル調製として、サンプルの液化、核酸の濃縮、核酸の放出、および連続する核酸の増幅を妨害する物質からの核酸の分離のそれぞれのステップからなる複数のステップまたはその結合が選択されてなる請求項 1 記載の装置。

【請求項 4】 前記第 2 の反応チャンバが、前記反応チャンバからの反応混合物を除去するための開口を有してなる請求項 1 記載の装置。

【請求項 5】 前記第 1 の反応チャンバが、核酸を固定化する手段を含んでなる請求項 1 記載の装置。

【請求項 6】 前記輸送経路が、3 方分配エレメントを含み、1 つの経路が前記第 1 および第 2 の反応チャンバのそれぞれに導かれており、第 3 の経路が廃棄物の輸送のために確保されてなる請求項 1、2、3、4 または 5 記載の装置。

【請求項 7】 少なくとも 1 個の前記反応チャンバが加熱されうる請求項 1 記載の装置。

【請求項 8】 前記第 2 の反応チャンバが増幅反応のための試薬の添加用の開口を有してなる請求項 1 記載の装置。

【請求項 9】 前記密閉されたシステムが使い捨てのモジュールからなる請求項 1 記載の装置。

【請求項 10】 前記密閉されたシステムが、本質的に同じデザインを有し、ともに差しこまれ、前記モジュールが多段階の反応操作を可能とするいくつかのモジュールからなる請求項 1 記載の装置。

【請求項 11】 低圧をかけることにより、少なくとも 1 個の前記反応チャンバが空にされうる請求項 1 記載の装置。

【請求項 12】 少なくとも 1 個の前記反応チャンバが、非磁気相から磁気相を分離するための磁気分離器を備えてなる請求項 1 記載の装置。

【請求項 13】 密閉されたシステムが広い範囲の応用の多様な反応容器として用いられる請求項 5 記載の装置。

【請求項 14】 液体をピペットによって注入する装置、請求項 1 記載の装置に続いて配設される装置、および請求項 1 記載の装置において気体または液体の、制御しうる輸送の装置からなることを特徴とする核酸を処理するシステム。

【請求項 15】 前記システムが 1 個またはいくつかの、請求項 1 記載の装置からなる反応チャンバからなる請求項 14 記載のシステム。

【請求項 16】 前記システムが 1 個またはいくつかの、第 1 および／または第 2 の反応チャンバに近接して位置づけられうる磁石を有する請求項 14 記載のシステム。

【請求項 17】 処理チャンバと閉じブタを真空操作することによって外部から開けうる、液体をもらさない閉じブタからなることを特徴とする核酸を含んだ液体の処理のためのモジュール。

【請求項 18】 前記閉じブタが前記処理チャンバの底にとりつけられたバルブである請求項 12 記載のモジュール。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、サンプル中の核酸を処理する装置および該装置を操作するシステムに関する。

【0002】

【従来の技術】 核酸の分析においては、臨床化学および臨床免疫学と比較すると、サンプル調製がきわめて重要な役割をはたす。ポリメラーゼ連鎖反応（米国特許第 4,683,195 号明細書参照）や転写反応に基づく増幅操作のような増幅操作が前述の分析の一部をなすばあい、サンプル調製はとくに重要なステップである。核酸の分析法は理論的に 3 つのステップに分けることができる。すなわち、サンプルからえられる核酸を使用されうるようにし、妨害サンプル成分から分離するサンプル調製のステップ、つぎに核酸量を増加する増幅ステップ、および生成した核酸を検出する検出ステップである。

【0003】 最近では、核酸の分析のための有用な試験、たとえば血液からの HIV の検出は、化学的および物理学的な一連の操作すべてを必要としている。それらは遠心分離、デカンテーション、抽出を含む。このサンプル調製の結果は、沈殿した核酸であり、この沈殿した核酸は、増幅反応でのさらなる処理のために、のちに再度溶解されている。

【0004】 欧州特許出願公開第 0389063 号明細書には、サンプル調製ののちに核酸をゲルに結合するという特別の変法が記載されている。また、この操作はサンプル液体からゲル粒子を分離するためにいくつかの遠心分離のステップからなっている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 核酸用サンプルを分析するばあいの特有の問題は、空気を介する外部からのコンタミネーションの危険であり、あるいはこの処理のために用いられる装置によって持ち越される、外来の核酸によるコンタミネーションの危険である。さらに、前述の方法も、サンプル容器を繰り返し開閉しなければなら

ないので、とくにコンタミネーションを受けやすい。

【0006】欧州特許第0381501号明細書には、核酸の増幅と増幅産物の検出のための装置が記載されており、そこでは増幅用の反応チャンバへサンプル標品がピペットで注入されている。増幅が完了すると、液体は検出チャンバへと移送され、そのあいだ環境との接触は排除されている。この装置は、増幅と検出のあいだのコンタミネーションを避けるのに適しているかも知れないが、欧州特許第0381501号明細書に記載の発明は、核酸はいつもPCRに直接用いられるわけではなく、核酸を調製するステップにも付されなければならないということを見逃している。

【0007】したがって、先行技術の欠点を避け、とくにコンタミネーションのない、単純な、核酸の処理のための装置を提供することが本発明の目的である。

【0008】

【課題を解決するための手段および作用】したがって、本発明の主題はサンプルからの核酸の処理のための装置であり、その装置は、他のサンプル成分から核酸を分離する第1の反応チャンバと、制御する輸送経路を経て前記第1のチャンバに接続される、核酸の増幅のための第2の反応チャンバとからなることを特徴とする。本発明の他の主題は本発明の装置に適用される、核酸処理のためのシステムである。

【0009】本発明の基礎をなす根本的な着想は、とくに有利な方法でひとつの簡単な装置で行なわれるべき、サンプル調製のステップと核酸増幅のステップとを結びつけることである。かかるステップの連結は今日に至るまで記述されることがない。

【0010】核酸は、本発明において理解されるように、一本鎖、二本鎖または多重鎖(multiple-strand)のDNAおよびRNAの両方のいかなるタイプの核酸をも含む。これらの核酸はいかなる種類のサンプルに含有されてもよく、とくに液体サンプルに含有されるのがよい。サンプルという用語は、物質の混合物と理解されるものを意味する。本発明の装置にそれらを使用する前に、サンプルはある処理に付されてもよく、またはそのままの状態、たとえば血液や尿のような体液の形態で直接用いられてもよい。

【0011】核酸の処理を必要とする異なる種類の方法が存在する。それらは、核酸を含む有機体による感染を検出するために必要であるような、サンプル中の核酸の検出の方法を含む。しかしながら、いくつかの処理ステップは、有機体の遺伝的状態を測定するための方法で行なうこともできる。これらの方法のすべてには、一連の処理ステップが必要である。核酸は、混合物の成分のなかでもごく小さい部分を構成しているだけなので、他のサンプル成分から核酸を分離することがしばしば必要である。所望の分離または精製の程度は、処理全体のなかで意図される用途に依存する。

【0012】核酸の増幅は、核酸の処理において一般的に知られているステップである。ポリメラーゼ連鎖反応のように、核酸の増幅のためのいくつかの変法が存在する。核酸の増幅とは、基本的にin vitroでの増幅を意味する。しかしながらin vivoでの増幅もまた原理的には考えられる。

【0013】本発明の主題は、ひとつの単一の装置において処理ステップの両方を結びつけることである。この方法では、核酸は第1の反応チャンバの中で他のサンプル成分から分離され、そして核酸は第2の反応チャンバの中で増幅される。本発明にしたがって、液体が一定時間に第1から第2の反応チャンバへと輸送されるように形成される、共通の輸送経路を介して両方の反応チャンバが接続される。

【0014】第1の反応チャンバにおいて核酸を分離する処理ステップは、用いられるサンプルの種類に依存して下記のステップにさらに分けることが可能な複合的な操作である。これらのサブステップは、本発明にしたがって互いに接続される1個以上の反応チャンバで行なわれてもよい。前記処理ステップは以下のサブステップからなることが可能である。

【0015】(a) 固体のまたは粘性のあるサンプルを液化する。

(b) 細胞または細胞のコンパートメントのような核酸を含有するコンパートメントを、一般に知られている適切な方法により分離する。

(c) 細胞または細胞のコンパートメントのような、核酸を含有するコンパートメントを適切な方法により増幅する(たとえば、欧州特許出願公開第0260280号明細書にしたがう)。

(d) 前述のコンパートメントから核酸を遊離する。

(e) 他のサンプル成分、とくに種々の増幅方法において阻害効果を有するもの、たとえばポリメラーゼ阻害剤、から核酸を分離する。

【0016】本発明にしたがえば、第1の反応チャンバにおけるこれらの処理ステップのどれも遠心分離を含まない。先行技術には可能な方法が記載され、酵素的分解反応、免疫的吸着または被覆された磁気粒子の使用のような異なる固相系を有するさまざまな免疫化学的な方法を含んでいる。核酸を分離することのできる方法は、フィルタ材料への核酸の保持、反応チャンバ中に含まれるシリカゲルまたはガラス粒子のような吸着体への核酸の(非特異的な)固定化、または親和性材料のような生物学的に特異的な吸着体への核酸の生物学的に特異的な固定化を含む。このばあい、固相において根本的に相補的な核酸とハイブリッドを形成するための核酸の性質が利用されてもよい。

【0017】核酸はまた、第1の反応チャンバ内においてクロマトグラフィーの操作により分離されてもよい。核酸の分離とは別に、核酸のための付加的な処理のステ

ップ、たとえば核酸を含む細胞の濾過、これらの細胞の溶解、または核酸の標識もまた第1反応チャンバ内において行なわれてもよい。本発明にしたがえば、ひとつのステップにおいて第1の反応チャンバ内で、欧州特許出願公開第0389063号明細書にしたがって核酸の溶解および固定化を行なうことが可能である。第1の反応チャンバ中において行なわれる処理によって、加熱エレメントを反応チャンバに近接して設けてもよい。これは細胞の溶解においてとくに可能である。

【0018】前述のすべての方法においては、核酸の増幅よりも先にコンタミネーションの危険と偽陽性の結果をうる危険性がかなり高い。また、サンプル調製のために記述されるプロセスは全く多岐にわたる。本発明の重要な主題は、したがって、高価でなく、モジュール式の使い捨てのプラスチック製品を使用することであり、このプラスチック製品は基本的に閉鎖系において多段階の工程に用いうる。したがって装置自身はコンタミネーションの危険なしに、少なくとも一つの反応チャンバ中に試薬を加えることを許容する、いくつかの開口を設けた、基本的に閉鎖系として存在する。本発明の第一の観点において、前記装置は多数の応用および使用に用いられる多様な反応容器である。

【0019】他のサンプル成分からの核酸の分離は、増幅された核酸が前記反応チャンバに残る一方、他のサンプル成分をともなう液体が第1の反応チャンバから取り除かれるときに終わる。これを実現するために第1の反応チャンバは、第1の反応チャンバへのサンプル採取の開口のみならず追加の開口を、好ましくは前記反応チャンバの底の、より低い部分に有し、そしてそれは以下、バルブ開口と称する。好ましい方法でこのバルブ開口は閉じられる。第1の反応チャンバにおいて前記サンプルが利用可能になると普通すぐに前記バルブ開口は閉じられる。核酸から他のサンプル成分を分離するためにバルブ開口は必要とされるだけできるだけ長いあいだ開けられ、そして他のサンプル成分が取り除かれる。

【0020】本発明において理解されるように、密閉するもの(closure)は、とくにバルブによる密閉であり、そしてそのバルブによる密閉は第1の反応チャンバを外側から真空にすることによって開けうるものである。第1の反応チャンバ中の圧力に関して、より低い圧力を作用させることによってそのサンプル成分は取り除かれる。もしこれらの成分がそれ以上の処理に付されないならそれらは捨てられ、好ましくは廃棄物用コンテナへと輸送される。

【0021】反応チャンバを満たすための開口、それは好ましくは反応チャンバの上部の部分にあるが、コンタミネーションの高い危険のゆえに自動的に操作できる適当なふたによって閉じられねばならず、閉じるために必要な見合った圧力補償(corresponding pressure compensation)を与える必要がある。以下、本発明にしたがった

解決策を記述する。

【0022】続いて、調製された核酸は、たとえば他のサンプル成分から分離され、そして第2の反応チャンバへと輸送され、そこでそれらは増幅される。第1の反応チャンバと第2の反応チャンバのあいだでさらなる精製または、他の処理ステップのために追加の反応チャンバを有することもまた可能である。核酸は第1の反応チャンバから溶液中に溶解することによって取り出される。核酸の固定化の種類によって、試薬こう配をつけることにより、脱離を起こす物質により、または置換により、これは達成することができる。好ましいプロセスは欧州特許出願公開第0389063号明細書からとくに知られる。

【0023】核酸を含む液体は輸送経路を経て第2の反応チャンバへと輸送される。本発明にしたがえば、この輸送経路は制御しうることが好ましい。輸送経路が含んでいる制御しうる手段は、核酸を含む溶液が第2の反応チャンバへと運ばれ、他のサンプル成分を含んでいる液体を運ばないことを確保することを意味する。この制御しうる手段はたとえば従来の3方コックという手段によって実現することができ、第1および第2の経路は第1および第2のチャンバへとそれぞれ導かれており、第3の経路は廃棄する経路である。他のサンプル成分をともなう液体が輸送経路を通して輸送されるべきときに、分配エレメントは第1反応チャンバからの経路を廃棄経路へと結びつけている。核酸を含んでいる溶液が第2反応チャンバへと移送されるべきときに分配エレメントは第1の反応チャンバからの経路が第2の反応チャンバへの経路と接続されるように切りかえられる。液体の流れを分ける追加的な可能性が知られている。分配エレメントは好ましくは中央制御ユニットを介して制御され、その結果、試薬の第1の反応チャンバへの追加、他の試薬成分をともなう液体または核酸を含む溶液の輸送の誘導、または分配エレメントの位置あわせを組み合わせることができる。

【0024】増幅反応に用いられる第2の反応チャンバは、核酸溶液を追加するのに先立つか、または第2の反応チャンバ中の核酸を含む溶液にこれらの試薬が開口を経て加えられるかによって必要な試薬を含んでいる。好ましい方法でコンタミネーションの危険を減少させるためのその開口は外部から閉じることができ、かつすべての増幅条件が調整されたのち直ちに閉じられる。のちにさらなる試薬の追加が必要なばあい、この開口は再度開けることができる。核酸の増幅の別の公知の可能性はたとえば欧州特許出願公開第0200362号明細書によればPCRである。この可能性が適用されるとき、第2の反応チャンバは、すべての温度変化をそこで急速に実現することができるように、好ましくは形成される。

【0025】増幅反応ののち、反応混合物は第2の反応チャンバ内でさらなる反応を実行するためにとどまるこ

とができ、または反応混合物はそこから除去されうる。これは前述の閉じることのできる開口によってか、または第1の反応チャンバになされたと同様に第2の開口のための設備が設けられうる。

【0026】核酸検出試験のために、たとえばドイツ特許出願公開4344742号明細書に記載されるように第2の反応チャンバにおいて、または追加の容器、たとえば第3の反応チャンバの中へと移したのちに検出を実行することができる。

【0027】本発明の装置の個々の部品は原理的には知られており、または容易に製造することができる。たとえばそれらはチューブ(tube)を含んでおり、その底に低い圧力をかけることによって開けることのできるバルブが備えつけられている。このばあいは、切り口を設けたゴム製の、唇の形をしたシーリングリップ(rubber sealing lip)であり、その中央が低い圧力の方向に伸び、チューブの底の外部への排出の開口が露出される。低い圧力をかけるのが終わったらそのゴム製シーリングリップは、はじめの位置へと急速にひき戻され外部への開口を閉じる。

【0028】前記チューブはプラスチックまたはガラス製のような適した材料から作製することができる。前記ゴム製シーリングリップは弾性ゴムまたは匹敵する弾性材料から作製することができる。その材料は負の低い圧力をかけて開けること、およびその逆もできる高い弾力性のあるものでなければならない。

【0029】製造は2つのステップにおいて達成することができる。すなわち、

(a) その底端部に突出部を設け、対応する形状をした底面を提供するため射出成形という手段によってプラスチックを加工する。

(b) 溶解法(melting process)で、その端にひだづけまたは、ふちまげ(crimp)した前記ゴム製シーリングリップをはめこみ、このようにして前記底面に前記ゴム製シーリングリップを取り付ける。

【0030】制御しうる輸送経路は筒状部材を用いることができ、硬質のプラスチック製パイプであることも可能である。分配エレメントは従来の3方分配エレメントを用いることができる。第2の反応チャンバは実際には試薬分析計から知られるいかなるチューブでも用いることができる。とくに有利な方法はバルブのような動く部品または分配エレメントを除き、発明の装置が1個の単一の部品に形成されることである。これは射出成形プロセスにおいて実施することができる。

【0031】本発明の装置の利点は使いすて装置として形成することができる点であり、すなわち核酸の分離およびその増幅ののち、および増幅された核酸を取り出したのちその装置は廃棄される。

【0032】本発明の装置の別の可能な実施態様は、実施されるべき処理の種類、用いられるサンプルの種類お

よび望ましい処理の種類によって、いかなる望ましい方法でも結合することのできる個別モジュールによって装置が構成されることを提案できる。本発明において用いられるモジュールは処理ステップのために備えられる装置であるということを意味しており、そしてこのモジュールは一連の処理ステップをたどるための他の装置に簡単な方法で接続され組合わされることができる。本発明の一観点において、装置は根本的に同一のデザインを有するスナップ留め(snap-on)式のモジュールからな

り、それゆえそれは多段階の反応を許容する。この点について同一のデザインは、少なくとも2個のモジュールが類似の外形形状を有しており、かつ排出開口をシールする閉じブタを開けるための同一の原理を特徴とすることを根本的に意味している。モジュールの反応チャンバの内容物に関して、モジュールの使用により大きな違いがありうる。1個のモジュールは、たとえばフィルタフリース(filter fleece)を含みうるし、別の1個は細胞の溶解のための試薬を含みうるし、しかもさらに別の1個は細胞または核酸の固定化のための材料を含みうる。

この点に関して、スナップ留め式モジュールという用語は、1個のモジュールの排出開口は別のモジュールの吸入開口に、迅速にかつ液をもらさない(liquid-tight)方法でとりつけることができるという意味で用いられている。モジュールは反応チャンバおよび閉じブタの外側から真空操作によって開けることのできる、液をもらさない閉じブタを有するものである。核酸を分離するために、モジュールはこの分離に必要な全ての材料および試薬を含み、そしてまた増幅反応に必要な特有の試薬をも含む。反応モジュールは分配モジュールを経て互いに結合されることができる。分配モジュールは反応モジュールと廃棄コンテナ、輸送経路と分配エレメントとを接続するエレメントを含む。

【0033】装置の内部において気体および、とくに液体を輸送することは毛细管力または低圧／真空操作のどちらかを介して確保される。低圧の使用が好ましい。これを達成するために廃棄物用コンテナおよび／または第2の反応チャンバにわずかに低い圧力をかける。

【0034】本発明の目的を達成するために、本発明の装置はサンプル調製のための第1の反応チャンバと、輸送経路を介して前記第1の反応チャンバと接続された、核酸の増幅のための第2の反応チャンバとからなることを特徴とする。

【0035】前記装置が、少なくとも1つの試薬を少なくとも1個の反応チャンバの中へと加えるために、コンタミネーションの危険なしにいくつかの位置に開口されうる密閉されたシステムであることが好ましい。

【0036】サンプル調製として、サンプルの液化、核酸の濃縮、核酸の放出、および連続する核酸の増幅を妨害する物質からの核酸の分離のそれぞれのステップからなる複数のステップまたはその結合が選択されてなる

10

20

30

40

50

ことが好ましい。

【0037】前記第2の反応チャンバが、前記反応チャンバからの反応混合物を除去するための開口を有してなることが好ましい。

【0038】第1の反応チャンバが核酸を固定化する手段を含んでなることが好ましい。

【0039】前記輸送経路が、3方分配エレメントを含み、1つの経路が前記第1および第2の反応チャンバのそれぞれに導かれており、第3の経路が廃棄物の輸送のために確保されてなることが好ましい。

【0040】少なくとも1個の前記反応チャンバが加熱されうることが好ましい。

【0041】前記第2の反応チャンバが増幅反応のための試薬の添加用の開口を有してなることが好ましい。

【0042】前記密閉されたシステムが使い捨てのモジュールからなることが好ましい。

【0043】前記密閉されたシステムが、本質的に同じデザインを有し、ともに差しこまれ、前記モジュールが多段階の反応操作を可能とするいくつかのモジュールからなることが好ましい。

【0044】低圧をかけることにより、少なくとも1個の前記反応チャンバが空にされうることが好ましい。

【0045】少なくとも1個の前記反応チャンバが、非磁気相から磁気相を分離するための磁気分離器を備えてなることが好ましい。

【0046】密閉されたシステムが広い範囲の応用の多様な反応容器として用いられることが好ましい。

【0047】また本発明のシステムは、液体をピペットによって注入する装置、請求項1記載の装置に続いて配設される装置、および請求項1記載の装置において気体または液体の、制御しうる輸送の装置からなる核酸を処理するシステムであることを特徴とする。

【0048】前記システムが1個またはいくつかの、請求項1記載の装置からなる反応チャンバからなることが好ましい。

【0049】前記システムが1個またはいくつかの、第1および/または第2の反応チャンバに近接して位置づけられうる磁石を有することが好ましい。

【0050】またさらに、本発明のモジュールは、処理チャンバと閉じブタに真空操作することによって外部から開けうる液をもらさない閉じブタからなることを特徴とする。

【0051】前記閉じブタが前記処理チャンバの底に取り付けられたバルブであることが好ましい。

【0052】

【実施例】以下、添付図面にしたがって本発明の装置を説明する。

【0053】図1(a)、(b)は本発明の装置の製造に用いることのできるモジュールを示す説明図である。その図は、閉じることのできる底部の排出開口を設けた

反応チャンバ用のユニバーサルモジュール1を示しており、当該排出開口はそれぞれ、その閉じられた状態および開いている状態で示されている。好ましい実施態様においてユニバーサルモジュールはいくつかの排出開口3と切り込みをつけられたゴム製シーリングリップ4を設けた底2を有している。

【0054】図1(c)は、排出開口3を設けた底2、および、スロット5を設けたゴム製シーリングリップ4の上面図である。低圧をかけるばあい、ゴム製シーリングリップ4はこのようにしてスロット5を伸長させ、排出開口3を解放する。図1(e)は通気孔6を備えた、上面開口部のためのフタの断面図である。図1(f)と図1(g)に示された実施態様は、図1(f)に示されたペーパーフリースディスク7と図1(g)に示された、切り込みをつけられたゴム製シーリングリップ8というコンタミネーション防護部材が備えられている。

【0055】図1(h)は第1の反応チャンバのための突出10、廃棄物用コンテナのための突出12、および連続する配置における第2の反応チャンバ14を備えられた第2のモジュール用の突出13を設けられた分配エレメント9を示している。開口15は、そこから試薬を追加することができ、フタ19を保持している。

【0056】図1(i)は第1の反応チャンバ11および第2の反応チャンバ14、廃棄物用コンテナ16、第1および第2の反応チャンバのための加熱エレメント17、および第2の反応チャンバと廃棄物用コンテナのための真空の発生に関する接続部品である真空用連結エレメント18を有する本発明の装置を示している。図示されたようにフタ19は第2の反応チャンバの近辺にある分配エレメント上に設けられる。スロットは第2の反応チャンバへと、核酸の増幅のための試薬を追加させることを可能にするのに用いることができる。さらに、磁石20は(たとえば非磁気相から粒子を)たとえば免疫吸着体という手段によって前述の細胞増幅(cell amplification)のための増幅反応のあいだ、または、そののちに磁気粒子を分離するのに用いることができることを示している。

【0057】平面配置におけるほかの実施態様が図1(j)に示されている。この図において分配エレメント21は溶液を分配エレメント中のフタの部分にまとめて入れている。毛細管22は第1の反応チャンバ11中のバルブが閉じられているときに第2の反応チャンバ14中に低圧を発生させることにより、第1の反応チャンバから第2の反応チャンバの中へと反応溶液を移すのに役立つ。種々の反応中で生じうるいかなる廃棄物をも底部の排出開口3を経て直接捨てることができる。図1

(i)に示されたように加熱エレメントと磁気分離器を含むことがまた可能である。

【0058】図2は免疫的な細胞吸着のために用いられるべき標準モジュールからなるコンタミネーションのな

い反応チャンバの変更可能なデザインの他の例を示している。図示された例において、フタ 19 はモジュールを閉め切っている。排出口となる突出 12、13 は真空にされるので、圧力を補償するための追加の通気孔 6 がたとえなくともモジュールからの液体の移送がすみやかに終了するであろう。

【0059】図 3 は免疫的吸着のための試薬を備えたモジュールと、核酸の増幅反応を実行するためのモジュールの結合をあらわす図式的な表現の図である。結合がうまく適合しているなら本発明にしたがったモジュールはそれぞれの処理ステップに適用することができ、図 1 (a) ないし図 1 (j) に示されるように、単純な基本モジュールからなる万能のシステムを与えるように見合った (corresponding) 加熱エレメントと磁気分離器を設けることができる。

【0060】図 4 は全血から核酸をサンプル調製し増幅する、本発明の装置を示している。反応モジュール 23 において溶解が実行される。必要な細胞は粗いフィルタ 24 をとおして残っている組織から分離される。その細胞は通気孔 6 における圧力補償によって免疫吸着体 25 に付着される。その細胞は pH 2 ないし 3 の範囲で緩衝液とともに溶出し、その懸濁液は反応が行なわれるチャンバ 26 の中へと移され、そこで細胞が溶解される。溶解物の全体はガラスフリースを含有するモジュール 27 の中へと移される。ついで核酸はこのフリースに吸着される一方、他のすべてのサンプル成分が濾過液中に残り、廃棄物とともに捨てられる。低イオン強度の緩衝液とともに除去されたのち、核酸を含む液体が、増幅用のチャンバ 14 の中へと移される。前述の装置内において液体の輸送は 1 個の単一の分配エレメント 28 である多重経路バルブ (multi-path valve) の手段によって低圧をかけることによって通風という手段によって実現される。

【0061】図 5 はエチレンジアミン四酢酸含有血液の処理のための単一ユニット装置を示す。液体は廃棄物用フリース 29 の作用によって輸送される (重力とともに作用する毛細管力によって)。プレインキュベーションたとえば、酵素的液化および前述の溶血が第 1 の容器であるモジュール 23 で起こる。このあとに免疫吸着体 25 が続く。そこで、核酸はそのとき、あとに続くガラスフリースを含有するモジュール 27 を経て固定化され、他のサンプル成分から分離される。続いて、核酸を含む溶液は増幅チャンバ 14 の中へと移される。このばあい、分配エレメント 28 は 3 方コックである。

【0062】図 6 は、DNA または RNA の検出のために HIV を含有する全血を処理するための概略図である。詳細については、図 1 についての記述で述べている。さらに磁石 20 が第 1 のモジュールに備えられている。そのうえ、図は、増幅された核酸が従来技術の試験管 30 に移され、そこで検出が行なわれることを示して

いる。この図については実施例 1 により詳細に記載する。

【0063】本発明の別の主題は、液体をピペットで注入する装置、請求項 1 の装置に続いて配設される装置および請求項 1 の装置中の気体または液体の輸送を制御する装置を含む、核酸処理用システムである。液体をピペットで注入するのに用いられる装置はテーキャン (Tecan、製造者名) によって製造されるような従来のピペット装置を用いることができる。これらの器具を用いて、サンプルおよび試薬貯蔵容器から核酸を含有するサンプル液、および、できるかぎりすべての必要な試薬の両者を本発明の装置の中へと移すことが可能である。本発明の装置では、輸送は好ましくは低圧をかけることによって制御される。これを達成するため、本装置の接続開口部は低圧を発生することのできる部材に連結されている。分配エレメントおよび／または低圧システムを制御することにより、個々の反応チャンバからの液体の輸送を所望に応じて継続することが可能となる。

【0064】本発明の別の主題は、つぎに示すステップにおいてサンプルから核酸を分離し、増幅する方法である。

【0065】—第 1 反応チャンバに核酸を固定化する。
—制御された輸送経路により、固定化された核酸から他のサンプル成分を除去する。

—核酸を固定化し、核酸を含む液体を、制御しうる輸送経路により第 2 の反応チャンバへと移す。

—第 2 の反応チャンバ内で核酸を増幅する。

【0066】本発明の利点は、高度に融通のきくモジュールの使用、コンタミネーションを最小にする可能性、核酸の分析におけるサンプル調製の増幅の自動化を含む。モジュールは、好ましくは使い捨て部品として設計される。しかしながら、本発明のもっとも重要な利点は、サンプル調製および増幅の際の、遠心分離を排除したことである。以下の実施例により、より詳細に本発明を説明するが、本発明はかかる実施例に限定されるものではない。

【0067】実施例 1 a

全血中の HIV-DNA の測定 (図 6)

ヒト抗体 (ベーリンガー・マンハイム・バイオケミカルズ (Boehringer Mannheim Biochemicals) 社製、カタログ番号 881171) およびストレプトタビジン-磁気粒子 (streptavidin-magnetic particle) (ダイナル (Dyna) 社製、オスロ、ノルウェー) および全血からの HIV-DNA を含む細胞を、ビオチン化抗ヘルパー T 細胞 / CD4 (anti-T-helper cells/CD4) によって、反応用のモジュールであるユニバーサルモジュール 1 中にて懸濁し、ついでインキュベートして第 1 の磁石 20 を介して保持する。真空用連結エレメント 18 を介して廃棄物用コンテナ 16 を真空にすることによって、過剰の全血を洗浄し、除去することができる。

【0068】適切な緩衝系たとえば、ロルフス(Rolfs)ら著(「PCR、クリニカル・ダイアグノスティックス・アンド・リサーチ(PCR: Clinical Diagnostics and Research)」、スプリングー・バーラッグ(Springer Verlag)発行(1982)84頁およびそれ以降)にしたがって、1%ローレス(Laureth)12または0.5%トウィーン20を含む緩衝系にプロテインアーゼKを添加するかまたは、アンダーソン著(「ダイアグノスティック・モレキュラ・バイオロジー、プリンシパルズ・アンド・アプリケーションズ(Diagnostic Molecular Biology-Principals and Applications)」、デー・エイチ・パーシング(D.H.Persing)、ティー・エフ・スミス(T.F.Smith)、エフ・シー・テンオーバー(F.C.Tenover)およびティー・ジェイ・ホワイト(T.J.White)編、アメリカン・ソサエティ・オブ・マイクロバイオロジー(American Society of Microbiology)、インターナショナル・スタンダード・ブック・ナンバー(15BN)1-55581-056-X(1993)197~202頁)にしたがって、ドデシル硫酸ナトリウムを用いて適切な緩衝系にプロテインアーゼKを添加すると、第1の加熱エレメント17の熱処理によってまず、細胞は再懸濁され、溶解する。磁石20を介して磁気粒子を保持し、真空用連結エレメント18を真空にしたのち、反応混合物を反応モジュールであるチャンバ14に移すことができる。

【0069】続いて、PCR試薬を自動的に開くフタ19を経て添加し、欧州特許出願公開第324474号明細書にしたがって反応モジュールであるチャンバ14の加熱エレメント17を介した熱サイクルを用いてDNAを増幅することができる。そののち、プライマーがハイブリダイゼーションする位置のあいだのPCR増幅産物に相補的な、ビオチン化DNA捕捉プローブを添加し、反応モジュールであるチャンバ14の加熱エレメント17を介して加熱することによりハイブリダイゼーションを行なう。続いて、真空用連結エレメント31を真空にし、ES分析器(ベーリンガー・マンハイム・ゲーエムベーハー(Boehringer Mannheim GmbH)製、カタログ番号1602845)を用いて、ストレプトアビジン(SA)で被覆された(ES)試験管(tube)30(ベーリンガー・マンハイム・ゲーエムベーハー製、カタログ番号1602845)での検出反応に全反応混合物を付し、そしてその結果を評価する。

【0070】実施例1b

欧州特許出願公開第389063号明細書にしたがって、非特異的にDNAを吸収する、シリカゲルを有するGuSCN緩衝液(silica gel with GuSCN buffer)と、PCR試薬とを置換することの変法は、2段階の方法を提案する。この方法を開始する前に、反応に用いるチャンバ14中に見合ったフィルタ層を挿入し、真空用連結エレメント32を真空にすることにより過剰の物質を除去する。低濃度の塩からなる緩衝液(low salt buffer)

(ブーム(Boom)ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクロバイオロジー(Journal of Clinical Microbiology)第28巻3号(1990)496頁にしたがい、10mM トリス-塩酸塩-1mM EDTA(pH 8.0))により、核酸をシリカゲルから溶出し、引き続きPCRを行ない、他の中間のモジュールにおいてハイブリダイゼーションおよび検出を行なう(実施例1a参照)。

【0071】実施例2

- 10 全血中のHIV-RNAの測定(図6)
 ロルフスら著(「PCR、クリニカル・ダイアグノスティック・アンド・リサーチ」、スプリングー・バーラッグ発行(1992))にしたがって、ユニバーサルモジュールにて全血を溶血に付す。続いて、SAで被覆された磁気ビーズ(製造者は実施例1と同一)を介して、ビオチン化された抗gp120抗体(ヒツジ)(アールト・バイオ・リジェンツ・リミテッド(Aalto Bio Reagents Ltd.)製、ダブリン、アイルランド)を加えることによってウイルス粒子を分離する。そののち、それらを実施例1aまたは1bにしたがって処理するが、ここでは、ウィルバー(Wilber)ら著、「ダイアグノスティック・モレキュラ・マイクロバイオロジー、プリンシパルズ・アンド・アプリケーションズ」、デー・エイチ・パーシング、ティー・エフ・スミス、エフ・シー・テンオーバーおよびティー・ジェー・ホワイト編、アメリカン・ソサエティ・オブ・マイクロバイオロジー、インターナショナル・スタンダード・ブック・ナンバー(15BN)1-55581-056-X(1993)327~331頁にと一致するよう、PCRとRNAの増幅のためのRT-PCRとを置き換える。

【0072】実施例3

組織の処理

- レビン(Lewin)ら著、「メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)」第171巻、「バイオメンブレンズ(Biomembranes)」、エス・フライシエル(S.Fleischer)およびビー・フライシエル(B.Fleischer)編、アカデミック・プレス(Academic Press)発行、444頁およびそれ以降、にしたがって、プロナーゼEDTA法またはコラーゲナーゼ-プロナーゼ-EDTA法により、反応モジュールであるユニバーサルモジュール1において加熱エレメント17によって37℃まで熱処理することにより、組織を個々の細胞にする。ガルシア・ペレッツ(Garcia-Perez)ら著、「メソッズ・イン・エンザイモロジー」第171巻、「バイオメンブレンズ」、エス・フライシエルおよびビー・フライシエル編、アカデミック・プレス発行、581頁、にしたがう特異的にビオチン化した細胞表面マーカーおよび磁気粒子(製造者は実施例1と同一)によって、実施例1aまたは1bにしたがうPCRに添加される特定の細胞を分離し、精製する。

【0073】実施例4

マイコバクテリア(mycobacteria)の診断のための唾液の消化

ロルフスら著、「PCR、クリニカル・ダイアグノスティック・アンド・リサーチ」、スプリングー・バーラッパ発行(1992)74頁およびそれ以降、に記載された方法による液化のために、唾液をN-アセチル-L-システイン/水酸化ナトリウム溶液とともに、反応モジュールであるユニバーサルモジュール1に加える。反応は、加熱エレメント17によってわずかに加熱することにより促進することができる。ガルシア・ペレッツラ著、「メソズ・イン・エンザイモロジー」第171巻、「バイオメンブレンズ」、エス・フライシエルおよびビー・フライシエル編、アカデミック・プレス発行581頁、にしたがって作製されるマイコバクテリアの表面マーカーに対する特異的ビオチン化抗体およびストレプトタビジンで被覆された磁気粒子(製造者は実施例1と同一)を用いることによって、原書の引用例に記載されている遠心分離のステップに取って代わることができる。そののち、特定の細胞を単離し、実施例3と同様に処理する。

【0074】実施例5

HIV-DNAの検出における細胞単離用カラムクロマトグラフィー

HIVを含むサンプルを添加する前に、反応モジュールであるユニバーサルモジュール1にストレプトタビジン結合プロモシアン活性化セファロース(ベーリンガー・マンハイム社製のストレプトタビジン、カタログ番号1097679、「イムンヘミシェ・キャラクテリジールング・デア・アーテーパー・シンセターゼ・フォン・エー・コリカー12(Immunchemische Charakterisierung der ATP-Synthetase von E. coli K 12)」ゲー・ビエンハウス、学位論文、ユニバーシティ・オブ・チュービンゲン(G. Bienhaus, Dissertation, University of Tuebingen)66頁(1980)に記載の方法)を充填する。ついで実施例1aにしたがって試薬を加える。反応が完了すると、ユニバーサルモジュール1に対応するフィルタ層を挿入して、ゴム製シーリングリップの部分から真空とすることにより過剰の物質を分離する。

【0075】実施例6

PCRに代わるNASBAの使用

PCRの代わりにNASBA法(キャンジーン(Cangen) (出願人)、米国特許第5,130,239号明細書)を用いることもまた可能であり、この方法においては反応モジュールであるチャンバ14にとりつけられた加熱エレメント17によって一定の温度が生じている。

【0076】実施例7

ガラスフリースに代わるイオン交換クロマトグラフィー
ガラスフリースに代わるイオン交換クロマトグラフィーの変法1bのかわりにドイツ特許第4139664号明

細書にしたがって核酸を単離する、イオン交換クロマトグラフィーを用いることもまた可能である。

【0077】

【発明の効果】本発明の利点は、高度に融通のきく、モジュールの使用、コンタミネーションを最小にする可能性、核酸の分析におけるサンプル調製の増幅の自動化を含む。モジュールは、好ましくは使い捨て部品として設計される。しかしながら、本発明のもっとも重要な利点は、サンプル調製の増幅の際に、遠心分離を排除したことである。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の装置を概略的に示す説明図である。

(a)ないし(g)、(h)および(j)は装置の各部分、(i)は各部分を組立てた全体をそれぞれ示す説明図である。

【図2】本発明のユニバーサルモジュールを概略的に示す説明図である。

【図3】本発明のユニバーサルモジュール2個を接続した状態を概略的に示す説明図である。

【図4】本発明の単一ユニット装置を概略的に示す説明図である。

【図5】本発明の単一ユニット装置を概略的に示す説明図である。

【図6】本発明の装置を概略的に示す図1の拡大詳細図である。

【符号の説明】

- 1 ユニバーサルモジュール
- 2 底
- 3 排出開口
- 4 ゴム製シーリングリップ
- 5 スロット
- 6 通気孔
- 7 ペーパーフリースディスク
- 8 スロットを設けたゴム製シーリングリップ
- 9、21、
- 28 分配エレメント
- 10、12、
- 13 突出
- 11、14、
- 26 チャンバ
- 15 開口
- 16 廃棄物用コンテナ
- 17 加熱エレメント
- 18、31、
- 32 真空用連結エレメント
- 19 フタ
- 20 磁石
- 22 毛細管
- 23、27 モジュール
- 24 粗いフィルタ

10

20

30

40

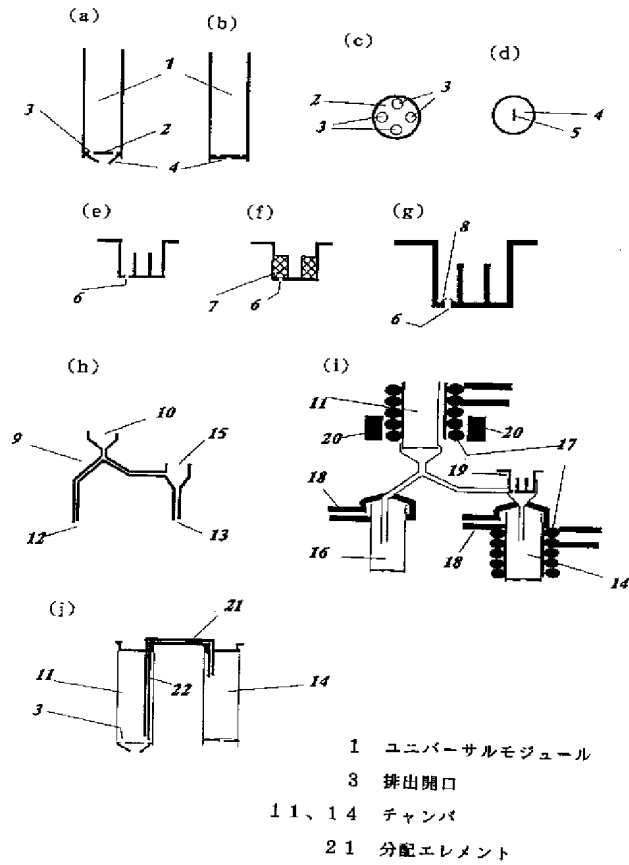
50

25 免疫吸着体
29 廃棄物用フリース

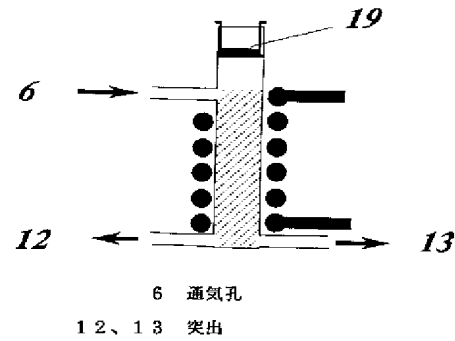
* 30 試験管

*

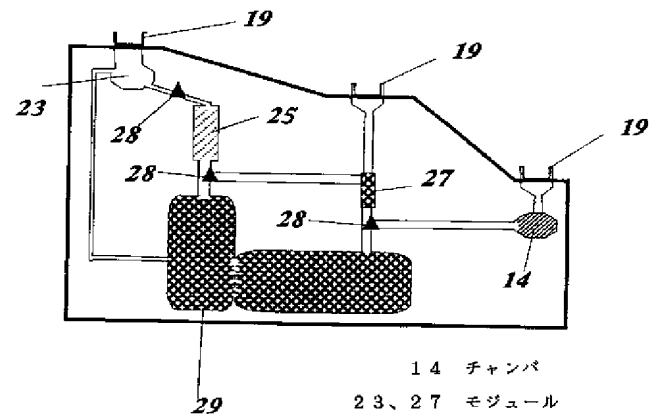
【図1】



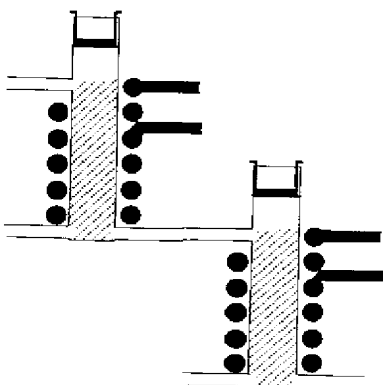
【図2】



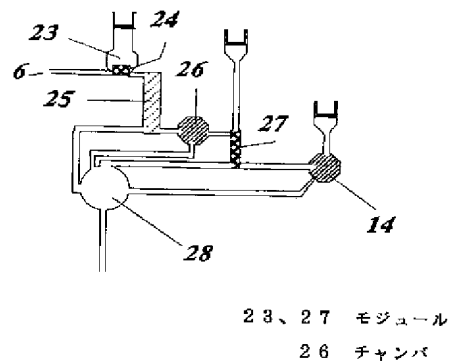
【図5】



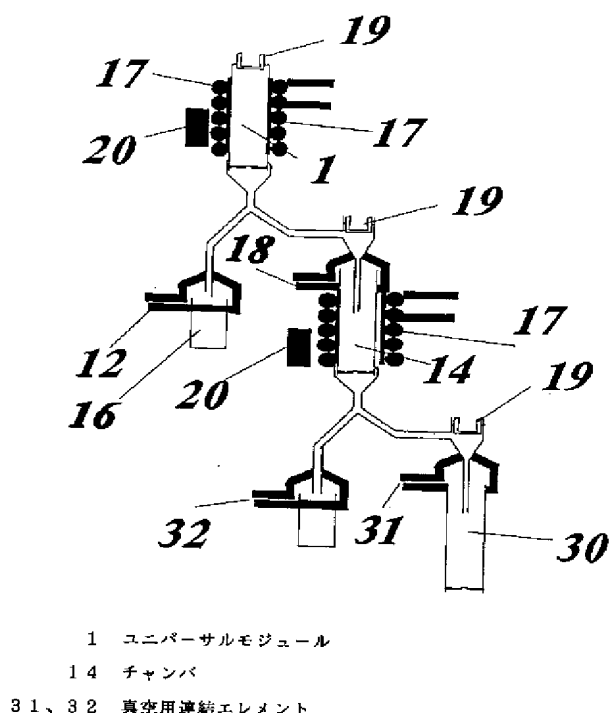
【図3】



【図4】



【図 6】



【手続補正書】

【提出日】平成 7 年 6 月 16 日

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 サンプル調製のための第 1 の反応チャンバと、輸送経路を介して前記第 1 の反応チャンバと接続された、核酸の増幅のための第 2 の反応チャンバとからなることを特徴とするサンプル中の核酸を処理するための装置。

【請求項 2】 サンプル調製として、サンプルの液化、核酸の濃縮、核酸の放出、および連続する核酸の増幅を妨害する物質からの核酸の分離のそれぞれのステップからなる複数のステップまたはその結合が選択されてなる請求項 1 記載の装置。

【請求項 3】 前記輸送経路が、3 方分配エレメントを含み、1 つの経路が前記第 1 および第 2 の反応チャンバのそれぞれに導かれており、第 3 の経路が廃棄物の輸送のために確保されてなる請求項 1 または 2 記載の装置。

【請求項 4】 少なくとも 1 個の前記反応チャンバが加熱されうる請求項 1 記載の装置。

【請求項 5】 前記密閉されたシステムが使い捨てのモジュールからなる請求項 1 記載の装置。

【請求項 6】 液体をピペットによって注入する装置、請求項 1 記載の装置に続いて配設される装置、および請求項 1 記載の装置において気体または液体の、制御する輸送の装置からなることを特徴とする核酸を処理するシステム。

【請求項 7】 処理チャンバと閉じブタを真空操作することによって外部から開けうる、液体をもらさない閉じブタとからなることを特徴とする核酸を含んだ液体の処理のためのモジュール。

フロントページの続き

(72)発明者 ゲルハルト ビーンハウス
ドイツ連邦共和国、デー82407 ヴィー
レンバッハ、カルヴェンデルシュトラッセ

1

(72)発明者 ハンス ランゲ
ドイツ連邦共和国、デー68623 ランペ
ルトハイム、レーメルシュトラッセ 99デ
ー